

doi: 10.11918/j.issn.0367-6234.2015.11.001

# 飞秒激光双光子荧光显微系统的构建与应用

秦一凡<sup>1</sup>, 李 茜<sup>1,2</sup>, 夏元钦<sup>1</sup>, 刘 斌<sup>1</sup>, 张 盛<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 可调谐(气体)激光技术国家级重点实验室, 150080 哈尔滨;

2. 国家仪器仪表元器件质量监督检验中心, 110043 沈阳)

**摘要:** 为进行双光子荧光显微成像研究, 搭建了一套飞秒激光光源双光子荧光显微成像系统. 对超短脉冲锁模激光器的成像优势、双光子激励饱和功率及系统分辨率进行了理论推导, 利用飞秒激光器、显微镜、数据采集设备与控制装置及扫描控制软件搭建了显微成像系统, 并对 Rhodamine B 样品进行双光子荧光显微成像实验. 结果表明: 相同条件下, 超短脉冲锁模激光器的双光子荧光产率为连续光输出激光器的  $10^5$  倍; 采用 UPLSAPO60XO 型物镜时, 双光子激励饱和功率为 50 mW, 理论横向和轴向分辨率为 303 nm 与 727 nm; 该系统具有显微成像能力, 且实际横向分辨率小于 3  $\mu\text{m}$ .

**关键词:** 飞秒激光; 双光子荧光; 罗丹明 B; 显微成像

中图分类号: TN431.2

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2015)11-0001-05

## Construction and application of femtosecond laser two-photon fluorescence microscopy system

QIN Yifan<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1,2</sup>, XIA Yuanqin<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>, ZHANG Sheng<sup>1</sup>

(1. National Key Laboratory of Science and Technology on Tunable Laser, Harbin Institute of Technology, 150080 Harbin, China;

2. National Supervising and Testing Center for the Quality of Instruments and Components, 110043 Shenyang, China)

**Abstract:** By using a femtosecond laser as the excitation source, a two-photon fluorescence microscopy system was constructed to conduct some researches on two-photon microscopy. Firstly, the advantage of introducing an ultrashort pulse mode-locked laser was verified, the definite expression of saturation power was calculated, and the resolution of two-photon fluorescence microscopy was deduced. Then based on the femtosecond laser, microscope, data acquisition device, control equipment and the software that we wrote, a two-photon fluorescence microscopy system was built. At last, the two-photon fluorescence microscopy system is applied into the microscopy study of Rhodamine B specimen. The results show that in the same condition, two-photon excitation productivity is as much as  $10^5$  times with an ultrashort pulse mode-locked laser compared with a CW laser. By using the UPLSAPO60XO objective, the saturation power is 50 mW while the radial and the axial resolution reach 303 nm and 727 nm. The image ability of the system is proved by the results, and the actual radial resolution is less than 3  $\mu\text{m}$ .

**Keywords:** femtosecond laser; two-photon fluorescence; Rhodamine B; microscopy

激光共聚焦显微镜采用激光作为光源, 解决了色差所造成的图像模糊问题. 提高图像质量、成像速度及图像分辨率<sup>[1-4]</sup>是激光共聚焦技术的研究重点. 共焦小孔的使用使得激励光与荧光的利用效率极低, 限制了图像质量的提高, 而成像速度的提高又降低了图像质量<sup>[5]</sup>. Denk 等<sup>[6]</sup>发明了第一台双光子荧光显微镜, 双光子荧光的非线性本质解决了共聚焦

对激励光和荧光利用效率低的问题, 从根本上提高了图像质量, 为提高成像速度提供了可能<sup>[7-8]</sup>. 双光子荧光显微镜无焦外荧光产生, 使其具有天然的高分辨率和高信噪比<sup>[9]</sup>. 商业双光子荧光显微镜价格昂贵且功能有限, 本文自行设计了一套费用较低且具有良好扩展性的双光子荧光显微成像系统, 并验证了系统的可行性.

收稿日期: 2014-09-15.

**基金项目:** 国家自然科学基金(61275157); 中央高校基本科研业务费专项资金(HIT.KLOF.2010033); 哈尔滨工业大学理工医交叉学科基础研究培育计划(HIT.IBRSEM.201314); 哈尔滨工业大学科技创新基金(HIT.NSRIF.2009011).

**作者简介:** 秦一凡(1990—), 男, 博士研究生;

夏元钦(1968—), 男, 教授, 博士生导师.

**通信作者:** 夏元钦, xiayuanqin@hit.edu.cn.

## 1 双光子荧光显微成像理论

### 1.1 超短脉冲锁模激光器用于双光子激励的优势分析

双光子荧光中, 单位时间内吸收的光子数  $N_{\text{abs}}$  如下式所示:

$$N_{\text{abs}}(t) = C\sigma_2 I_0^2(t) \int_V dr S^2(r). \quad (1)$$

式中:  $C$  表示染料浓度;  $V$  表示被照射体积;  $\sigma_2$  表示双光子吸收截面; 函数  $S(r)$  和  $I_0(t)$  分别描述入射激光的空间和时间分布。

在不存在受激发射与荧光淬灭时, 单位时间内探测器收集的荧光光子数可表示为

$$F(t) = \frac{1}{2} \phi \eta N_{\text{abs}}. \quad (2)$$

其中  $\phi$ 、 $\eta$  代表探测设备的荧光收集效率以及染料的荧光量子效率。

按时间平均的光子通量  $\langle F(t) \rangle$  的表达式为

$$\begin{cases} \langle F(t) \rangle = 0.5 \phi \eta C \sigma_2 \langle I_0(t) \rangle^2 \int_V dr S^2(r), \\ g^{(2)} = \frac{\langle I_0^2(t) \rangle}{\langle I_0(t) \rangle^2}. \end{cases} \quad (3)$$

其中  $g^{(2)}$  描述的是激励光源的二阶时间相干性。若选择锁模激光器作为光源, 时间相干因子  $g^{(2)}$  可由输出脉宽  $\tau$  及激光器重频  $f$  表示

$$g^{(2)} = \frac{g_p^{(2)}}{f\tau}. \quad (4)$$

其中  $g_p^{(2)}$  由脉冲形状决定且无量纲, 本实验中为高斯脉冲,  $g_p^{(2)}$  为 0.66。由锁模激光器的输出脉宽为 100 fs, 重频为 80 MHz, 可以计算出  $g_p^{(2)}/f\tau \approx 10^5$ 。这也意味着, 假设平均功率不变, 使用的激励光源为超短脉冲锁模激光器激励实验样品时, 双光子荧光的产生效率约为使用连续光输出激光器的  $10^5$  倍, 因此超短脉冲锁模激光器用于双光子激励具有较大优势。

## 1.2 双光子激励饱和功率估算

双光子激励的饱和功率为<sup>[10]</sup>

$$P_{\text{saturation}} \approx \frac{(0.61)^2 hc \lambda f \tau}{(N_{\text{NA}})^2 (\sigma_2 \cdot \tau)^{\frac{1}{2}}} = \frac{(0.61)^2 hc \lambda f \tau^{\frac{1}{2}}}{(N_{\text{NA}})^2 \sigma_2^{\frac{1}{2}}}. \quad (5)$$

式中:  $h$  表示普朗克常量;  $c$  表示真空中光速;  $\lambda$  表示入射光波长; 而  $N_{\text{NA}}$  是聚焦物镜的数值孔径。

本实验中, 飞秒激光器输出的锁模激光中心波长为 800 nm, 其重频为 80 MHz; 物镜为 Olympus 生产的万能平场复消色差 UPLSAPO60XO 型物镜, 其具有 1.35 的数值孔径; 实际实验中, 激光经过各类光学元件后脉宽被展宽至 200 fs; 假设双光子荧光吸收截面的面积为  $5 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$ ; 综上, 饱和功率大约为 50 mW。

## 1.3 双光子显微成像技术的分辨率

依据菲涅耳衍射中的旁轴近似理论, 焦点处的束腰可以用来表示横向分辨率<sup>[11]</sup>

$$r = 2\omega_0 = 2 \frac{\lambda}{\pi} \frac{\sqrt{1 - \sin^2 \alpha}}{\sin \alpha}. \quad (6)$$

其中  $\lambda$  表示入射激光波长,  $\alpha$  表示会聚角。此时假设飞秒激光器输出脉冲为高斯形状。

可以将式(6)写成物镜数值孔径  $N_{\text{NA}}$  的函数形式

$$r = 2\omega_0 = 2 \frac{\lambda}{\pi} \frac{\sqrt{1 - \left(\frac{N_{\text{NA}}}{n}\right)^2}}{\frac{N_{\text{NA}}}{n}}. \quad (7)$$

轴向分辨率取决于入射激光在焦点附近轴向上的分布, 可以表示为以下形式:

$$z = 2 \frac{\lambda}{\pi} \frac{1 - \left(\frac{N_{\text{NA}}}{n}\right)^2}{\left(\frac{N_{\text{NA}}}{n}\right)^2}. \quad (8)$$

值得注意的是, 高数值孔径成像系统中入射激光经物镜聚集后便会迅速聚集起来, 这是由于会聚角通常较大导致的, 而此时将无法满傍轴近似理论中的小角度近似条件, 因此式(7)、(8)仅适用于数值孔径较小的情况。

对应于高数值孔径系统的衍射理论由 Richards 和 Wolf 提出, 基于该理论可以得到分辨率的另一种计算方法<sup>[12]</sup>:

$$r = \begin{cases} \frac{0.32\lambda}{\sqrt{2}N_{\text{NA}}}, & N_{\text{NA}} \leq 0.7; \\ \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2}N_{\text{NA}}^{0.91}}, & N_{\text{NA}} > 0.7. \end{cases} \quad (9)$$

$$z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[ \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - N_{\text{NA}}^2}} \right]. \quad (10)$$

根据本实验的基本情况, 可以估算出系统分辨率。实验中应用 UPLSAPO60XO 型物镜, 折射率为 1.515 的松柏油作为填充介质, 锁模激光器的中心波长为 800 nm。根据式(7)~(10)可知, 菲涅耳衍射理论的计算结果为理想计算结果, 其横向分辨率及轴向分辨率分别为 259 nm 和 132 nm, 而 Richards 和 Wolf 衍射理论的计算结果为 303 nm 和 727 nm。通常情况下, 使用数值孔径更大的物镜并适当缩短入射激光波长可以提高系统成像分辨率。

## 2 双光子荧光显微成像系统

### 2.1 实验装置及控制软件介绍

实验中所使用的装置及软件如下:

1) 飞秒可调谐激光光源为掺钛蓝宝石固体激光器 Tsunami, 其输出脉宽约 50 fs, 中心波长

800 nm;

2) 二向色镜为 Chroma 公司的 680dcspxr. 从其透过率和反射率特性可知该二向色镜对波长大于 720 nm 的光反射率高达 95%, 同时透过率小于 5%, 因此可以对入射激光形成很好的截止作用. 其对 450~650 nm 范围的光透过率高达 95% 以上, 而荧光波长在此范围内;

3) 发射滤光片为短波滤光片与带通滤光片. 短波滤光片是 Chroma 公司的 NC212066-ET670sp 型产品, 其对 400 nm 至 660 nm 范围内的大部分光透过率高达 99%. 带通滤光片为兆九光公司的 BP580-70K 型产品, 可用于对 Rhodamine B 样品的实验, 该滤光片的透过中心波长为 580 nm, 半宽为 70 nm;

4) 扫描方式为机械扫描, 平移台为 Prior 公司的 H117P2IX, 其扫描速度基本满足实验需求, 根据扫描平台参数估计一幅像素为 128×128 成像时间约为 40 min;

5) 物镜为 Olympus 公司的 PLN 40X 与 UPLSAPO60XO. 当物镜为 PLN40X 时, 根据式 (7) 得到横向分辨率为 596 nm; 当物镜为 UPLSAPO60XO 时, 根据式 (9)~(10) 得到横向分辨率为 303 nm;

6) 利用 C# 语言编写了扫描控制软件, 该软件在控制平移台移动时, 同时记录了各点坐标值及对应坐标位置的输出电信号. 目前本实验室正参照国际上其他小组编写的 ScanImage、MPscope 双光子显微成像软件, 编写功能更加全面的扫描控制软件.

## 2.2 显微成像系统的搭建过程及参数确定

双光子荧光显微成像系统搭建方案的主要光路如图 1 所示.

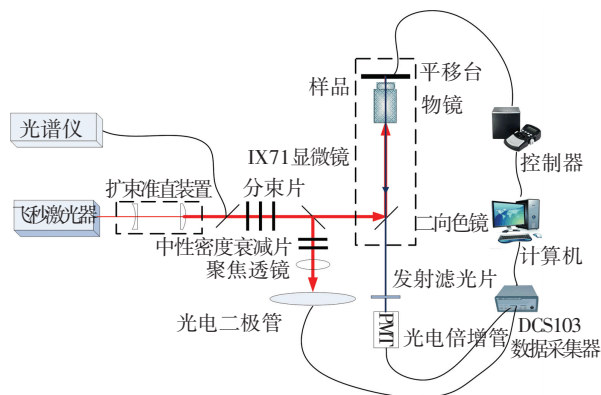


图 1 双光子荧光显微成像系统实验装置示意

激光脉冲由掺钛蓝宝石固体激光器 Tsunami 发出, 利用扩束准直装置将飞秒激光变成准平行光, 确保此时光斑稍大于物镜入瞳. 第一分束片将激光分为两束, 其中一束激光与 Ocean Optics HR400 光谱仪相连接, 从而实时监测激光器是否为锁模状态. 利用中性密度衰减片将另一束激光衰减, 随后激光射

入第二分束片, 分束后的一部分激光穿过透镜到达 PIN 型光电二极管, 透镜之前同样放置了中性密度衰减片衰减激光, 以防止由于光电二极管的低阈值引起的饱和现象. 另一部分激光入射生物显微镜, 二向色镜将激光反射至物镜, 用于激励样品以产生双光子荧光信号, 通过二向色镜的荧光信号穿过发射滤光片并到达光电倍增管, 发射滤光片为一短波滤光片或带通滤光片, 可以减少由激光与杂散光所形成的噪声, 提高信噪比. 利用 DCS103 数据采集系统采集光电倍增管及光电二极管的输出电信号. 计算机利用扫描控制软件对电信号进行处理. 计算机还利用扫描控制软件控制控制器, 从而实现对平移台移动的实时控制以完成扫描过程.

激光器的长时间工作将会影响谐振腔的温度, 并可能导致形变的发生, 而且机械扫描速度较为缓慢, 入射激光会存在能量抖动. 由于双光子荧光信号强度正比于激光强度的平方, 激光强度每增大一倍就使得荧光信号强度增大三倍. 如图 1 所示, 在系统中添加了 PIN 型光电二极管作为能量诊断装置. 由于使用的分束片比例固定, 可以通过 PIN 型光电二极管的输出信号实时监测入射激光的能量抖动, 以保证系统的稳定性与实验数据的可靠性.

## 3 双光子荧光显微成像实验研究

为了验证双光子荧光显微成像系统的成像能力, 对图 2 中的 Rhodamine B 染料表面进行成像.

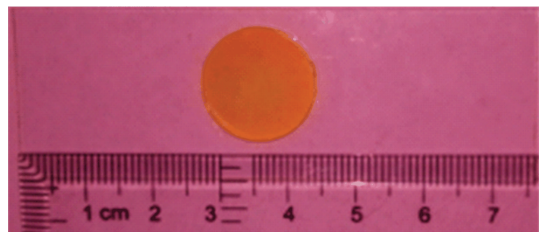
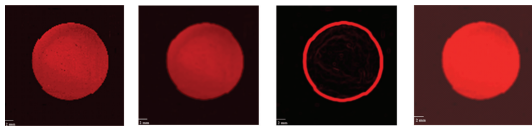


图 2 Rhodamine B 固体染料照片

利用双光子荧光显微成像系统对固定在载玻片上的 Rhodamine B 固体样品进行扫描成像, 得到的图像像素为 128×128, 如图 3 所示. 其中图 3(a) 未经处理. 实验中使用的物镜为 PLN40X, 其放大倍数 40×、数值孔径 0.65. 由于双光子荧光信号只有在焦点附近才能产生, 并且 PLN40X 物镜的聚焦后焦点很小, 固体染料表面的细微变化就可以影响荧光信号的强弱甚至有无, 图 3(a) 中的黑点就由此产生. 图 3(b) 中对图像进行了平滑及去噪处理, 图 3(c) 为边缘检测结果, 图 3(d) 对图像进行了平滑及增强处理. 图 2、3 证明该系统具有对样品进行双光子显微的成像能力.



(a)未处理 (b)平滑去噪 (c)边缘检测 (d)平滑增强

图 3 Rhodamine B 固体染料双光子荧光成像及处理结果

取少量 Rhodamine B 溶液滴在载玻片上风干,风干后的 Rhodamine B 固体粉末状分布于载玻片上,图 4 的放大倍数为 100 倍,Rhodamine B 风干后的固体粉末具有清晰的边缘.利用双光子荧光显微成像系统对 Rhodamine B 粉末进行显微成像研究,并将得到的结果与宾得 K-x 数码单反相机拍摄的照片进行对比.

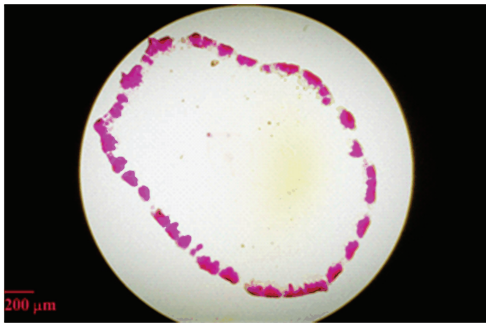
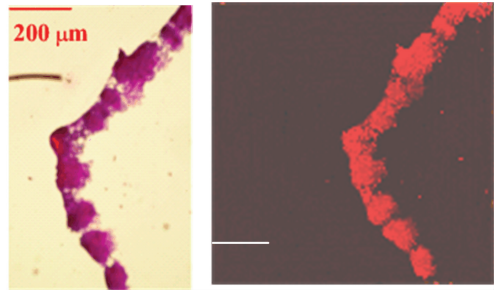


图 4 Rhodamine B 样品拍摄照片

利用相机从目镜口进行拍摄,得到 Rhodamine B 样品照片,如图 5(a)所示.物镜放大倍数为 10×,目镜放大倍数为 10×,显微镜内置变倍器放大倍数为 1.6×,因此总的放大倍数应为 160×.需要说明的是拍摄的照片并不能包含整个视场.图中左上方的曲线为载玻片划痕,与 Rhodamine B 粉末成像结果无关.对 Rhodamine B 粉末完成双光子荧光显微成像并对所得到的图像进行处理,结果如图 5(b)所示,其尺寸为 1 016 μm×1 016 μm.通过图 5 可以看到,双光子荧光显微成像系统得到的图像与相机从目镜口拍摄得到的结果想吻合.但由于相机拍摄的图片像素为 4 288×2 848,相机拍摄所得结果更加清晰,而双光子荧光显微成像结果的像素只能达到 128×128.由于机械扫描速度的限制,实验中需要耗时 42 min 才能得到一幅像素为 128×128 的图像,耗时 168 min 才能得到一幅像素为 256×256 的图像,这无疑会影响了双光子荧光显微成像系统的图像分辨率.本实验室正在搭建的振镜扫描系统将提高扫描速度,从而提高分辨率.

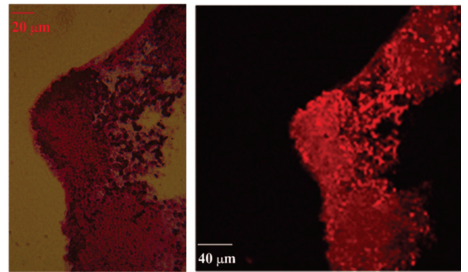
随后使用 PLN40X 物镜,利用相机从目镜口进行拍摄,得到的结果如图 6(a)所示,利用双光子荧光显微成像系统对样品进行成像并处理所得图像,结果如图 6(b)所示,其像素为 128×128,尺寸为 304.8 μm×304.8 μm.对比图 6(a)与图 6(b),发现

双光子荧光显微成像系统得到的图像具有较为清晰的细部特征,而只要增加成像的像素就可以提高图像清晰度,因此双光子荧光显微成像系统可以在几百微米大小的动植物细胞研究中得以应用.



(a) 拍摄照片 (b) 显微成像

图 5 Rhodamine B 样品成像(1 016 μm×1 016 μm)



(a) 拍摄照片 (b) 显微成像

图 6 Rhodamine B 样品成像(304.8 μm×304.8 μm)

最后,利用 UPLSAPO60XO 物镜对图 4 中任意区域进行双光子荧光显微成像实验,得到的结果如图 7 所示,其像素为 128×128,尺寸为 60.96 μm×60.96 μm.黄色箭头所指的两个荧光点间距不超过 3 μm,但两个点轮廓清晰且没有重叠区域,据此认为该显微成像系统的横向分辨率应该小于 3 μm.如果能够制备出间距更小的荧光点,就可以进一步验证横向分辨率的大小,由于荧光采集设备、杂散光影响以及图像处理的问题,横向分辨率虽会逐渐接近理想分辨率 303 nm,但仍会有差距.

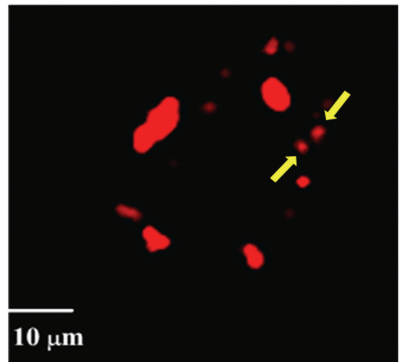


图 7 Rhodamine B 样品显微成像(60.96 μm×60.96 μm)

以上所有的 Rhodamine B 样品成像研究中,实验过程中光纤光谱仪输出显示激光器锁模正常,能

量诊断装置监测的激光能量抖动均不超过 3%, 因此推断激光能量的抖动对荧光产生影响低于 6%.

## 4 结 论

1) 研究了双光子荧光显微成像原理, 分析了超短脉冲锁模激光器用于双光子荧光显微成像优势, 估算了双光子激励饱和功率, 并对双光子荧光显微成像分辨率进行了理论分析.

2) 搭建了双光子荧光显微成像系统, 并考虑了环境因素对飞秒激光器的影响, 添加光纤光谱仪及能量诊断装置以避免失锁及能量抖动的发生.

3) 对 Rhodamine B 样品进行双光子荧光显微成像实验, 证实了该系统具有显微成像能力.

4) 该系统可以清晰地分辨出微米量级样品, 横向分辨率小于  $3 \mu\text{m}$ ; 由于采用机械扫描方式, 生成一幅像素为  $128 \times 128$  的图像需要约 42 min.

## 参考文献

[1] RUST M J, BATES M, ZHUANG Xiaowei. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (10): 793-796.

[2] GUSTAFSSON M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.

[3] KRICHEVSKY O, BONNET G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications [J]. *Reports on Progress in Physics*, 2002, 65(2): 251. doi:

10.1088/0034-4885/65/2/203.

[4] HESS S T, HUANG Shaohui, HEIKAL A A, et al. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(3): 697-705.

[5] PATEL Y G, RAJADHYAKSHA M, DIMARZIO C A. Optimization of pupil design for point-scanning and line-scanning confocal microscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(8): 2231-2242.

[6] DENK W, STRICKLE J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, 248 (4951): 73-76.

[7] IYER V, HOOGLAND T M, SAGGAU P. Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2006, 95(1): 535-545.

[8] SACCONI L, FRONER E, ANTOLINI R, et al. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(20): 1918-1920.

[9] SVOBODA K, YASUDA R. Principles of Two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience [J]. *Neuron*, 2006, 50(6): 823-839.

[10] HELMCHEN F, DENK W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.

[11] SHEN N. Photodisruption in biological tissues using femtosecond laser pulses [D]. Cambridge: Harvard University, 2003.

[12] ZIPFEL W R, WILLIAMS R M, WEBB W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1369-1377.

(编辑 张 宏)

## 封面图片说明

图片是利用 40 倍物镜对 Rhodamine B 固体粉末进行显微成像的结果, 左侧为数码单反相机拍摄所得结果, 右侧为飞秒激光双光子荧光显微成像所得结果, 通过对比发现双光子荧光成像具有较高的图像分辨能力。飞秒激光双光子荧光显微成像技术是一种具有微米级分辨能力的成像技术, 相较于传统的共聚焦显微成像技术, 其具有分辨率高、信噪比高、成像深度高等优点。利用双光子荧光技术, 不仅能够对动植物组织的细部结构进行观察, 还可以对动植物生理活动进行实时观测。本文构建了一套完整的飞秒激光双光子荧光显微成像系统, 并对 Rhodamine B 样品进行了显微成像实验。该系统的横向分辨能力小于  $3 \mu\text{m}$ , 证实了其优越的成像性能。

(图文提供: 秦一凡, 李茜, 刘斌, 张盛, 夏元钦. 哈尔滨工业大学可调谐(气体)激光技术国家级重点实验室.)